

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. Mai 2001 (31.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/37787 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 6/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/11187**
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
17. November 2000 (17.11.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 55 746.2 19. November 1999 (19.11.1999) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **ESPE DENTAL AG [DE/DE]; Espe Platz, 82229  
Seefeld (DE).**
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HÄBERLEIN,  
Ingo [DE/DE]; Eichweide 3, 82362 Weilheim (DE).  
LUCHTERHANDT, Thomas [DE/DE]; Bergstrasse 20,  
82152 Krailling (DE). HECHT, Reinhold [DE/DE]; In-  
ninger Strasse 6, 82266 Inning-Buch (DE). FREY, Oliver  
[DE/DE]; Ringstrasse 13b, 82131 Gauting-Königswiesen  
(DE).**
- (74) Gemeinsamer Vertreter: **ESPE DENTAL AG; ESPE  
Platz, 82229 Seefeld (DE).**
- (81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).**
- Veröffentlicht:**
- Mit internationalem Recherchenbericht.
  - Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: **SURFACE TREATMENT AGENT FOR LAMINATED FABRIC**

(54) Bezeichnung: **OBERFLÄCHENBEHANDLUNGSMITTEL FÜR HARTGEWEBE**

(57) Abstract: The invention relates to a surface treatment agent for laminated fabric which comprises at least one enzyme and at least one agent that limits enzyme activity, whereby the surface treatment agent remains on the laminated fabric during use.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Oberflächenbehandlungsmittel für Hartgewebe, umfassend mindestens ein Enzym und ein die Enzymaktivität begrenzendes Mittel, wobei das Oberflächenbehandlungsmittel bei der Anwendung auf dem Hartgewebe verbleibt.

WO 01/37787 A1

## Oberflächenbehandlungsmittel für Hartgewebe

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der adhäsiven Befestigung von Dentalmaterialien auf der Zahnhartsubstanz durch Modifizierung  
5 der nach der Präparation bzw. dem Ätzen vorhandenen Kollagenschicht.

Zur Befestigung von Dentalmaterialien auf der präparierten Zahnhartsubstanz werden nach heutigem Stand der Technik durch den Behandler folgende Arbeitsschritte durchlaufen:

1. Anätzen der gesamten Zahnhartsubstanz durch eine Säure ("total-etch-  
10 Technik").
2. Auftragen eines sog. Primers, der oberflächlich in die Zahnhartsubstanz einpenetriert.
3. Auftragen eines sog. Bondings, welches zusammen mit dem Primer eine Hybridschicht bildet.
- 15 4. Polymerisation des Bondings (z.B. durch Bestrahlen mit Licht und/oder durch Redox-Reaktion).
5. Aufbringen des Dentalmaterials.

Um die Anzahl der anzuwendenden Bestandteile zu verringern, wurden der Primer und das Bonding – oder auch Versiegler - zu einer Komponente zusammengefaßt  
20 (sog. Einfaschen-Bondings, z.B. Prime & Bond 2.1, Fa. Dentsply/Detray, Dreieich). Dennoch muss zuerst geätzt und gespült werden, um die bei der Präparation entstandene Schmierschicht - ein Gemisch, das im wesentlichen aus Hydroxylapatit und Kollagen besteht – von Hydroxylapatit zu befreien, damit anschließend das Einfaschen-Bonding mindestens einmal aufgetragen und anschließend polymerisiert  
25 werden kann, bevor das Dentalmaterial zur Anwendung kommt. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass die Effizienz dieser vereinfacht anzuwendenden Adhäsive in Frage zu stellen ist (R. Frankenberger, N. Krämer, J. Sindel; Dtsch. Zahnärztl. Z., 51, (1996), 556-560). Insbesondere die Lebensdauer des Haftverbundes nimmt bei diesem vereinfachten Vorgehen stark ab.

Eine andere Vereinfachung des oben beschriebenen Verfahrens zur adhäsiven Befestigung von Dentalmaterialien besteht darin, den Primer und das Ätzmittel zu einer Komponente zu kombinieren (sog. selbstätzende Primer; z.B. Etch & Prime 3.0, Fa. Degussa; Clearfill-Liner Bond 2.0, Fa. Kuraray, Osaka). Diese müssen nur  
5 noch aufgetragen und nicht mehr abgespült werden – sogenanntes "Modifizieren der Schmierschicht" - , ihnen folgt entweder das zu polymerisierende Bonding (z.B. Clearfill-Liner Bond 2.0, Fa. Kuraray, Osaka) oder zumindest aber ein Vernetzungsschritt zur Polymerisation des selbstätzenden Primers, bevor das Dentalmaterial verwendet werden kann.

10 Nach dem ersten Arbeitsschritt (Ätzung der Zahnhartsubstanz) liegt auf dem Dentin ein Netzwerk von freigelegten Kollagenfasern vor. Durch die folgende Applikation des Primers bzw. des Bondes (Einfaschen-Variante) entsteht nach erfolgter Polymerisation, initiiert durch die Belichtung und/oder Redoxreaktion, eine sog. Hybridschicht. Diese Hybridschicht besteht aus Kollagenfasern, die zusammen mit  
15 den ausgehärteten Monomeren des Primers und/oder Bondes ein interpenetrierendes Netzwerk bilden. Nach gängiger Lehrmeinung ist diese Hybridschicht hauptverantwortlich für die Haftung zwischen Zahnhartsubstanz und Dentalmaterialien (N. Nakabayashi et.al., J. Biomed. Mater. Res., 1982, 16, 265-273; R.L. Erikson, Am. J. Dent. 1989, 2, 117-123; D.H. Pashley, Trans. Acad. Dent. Mater.,  
20 1990, 3, 55-73; B.v. Meerbeek, Promotion 1993, Katholieke Universiteit te Leuven). Des weiteren wirkt die Hybridschicht als elastischer "Puffer" zwischen Zahnhartsubstanz und Dentalmaterial, da das Elastizitätsmodul in etwa zwischen beiden Materialien liegt. Insgesamt ist die Hybridschicht also ein wesentlicher Bestandteil, der zum Erfolg der Präparation und Gesundheit der verbleibenden Zahnhart-  
25 substanz entscheidend beiträgt.

Es gibt auch Untersuchungen, die zeigen, dass nicht imprägnierte Teilbereiche der Kollagenschicht die Verbindung zwischen Zahnhartsubstanz und Dentalmaterial schwächen und möglicherweise zu einem beschleunigten Nachlassen dieser Verbindung führen (J.D. Eick, Proc. Fin. Dent. Soc., 1992, 88 (1 Suppl.), 225-242; N.  
30 Nakabayashi et.al; Dent. Mater., 1992, 8, 125-130).

Um eine gute Hybridschicht am Dentin zu erreichen, ist eine vollständige Benetzung aller Kollagenfasern und damit die Beachtung und pedantische Einhaltung der

Herstellervorschriften notwendig (B.v. Meerbeck et.al., Dtsch. Zahnärztl. Z. 1994, 49, 977-984). Die Benetzung der Kollagenfasern mit den verschiedenen Bondingmaterialien ist aber von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Dicke und Trockenheit der Kollagenschicht, der Faserlänge und Hydrophilie der Bonding-Monomermatrix abhängig. Hinzu kommt, dass der Kollagenanteil in der Zahnhartsubstanz und je nach individueller Charakteristik des Patienten unterschiedlich bzw. variabel ist. Damit ist die Herstellung eines guten Haftverbundes in der zahnärztlichen Praxis eine extrem technik- und substanzsensitive Arbeit, die nur selten zu vorhersagbaren Ergebnissen führt (J. Perdigao et.al., Dent.Mater., 1997, 13, 218-227; B.v. Meerbeck et.al., Philip Journal, 1997, 9-10, 313-315).

Die US-A-5 762 502 beschreibt eine Methode bei der entweder die nach der Präparation entstandene Schmierschicht durch Behandlung mit Metalloproteinasen oder Kollagenasen entfernt werden kann (Ersatz des Ätzschrittes) oder aber nach dem Ätzen das freiliegende Kollagen durch diese Enzyme vollständig entfernt wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, es die aus dem Stand der Technik bekannten Probleme zu vermeiden und ein verbessertes Oberflächenbehandlungsmittel für Hartgewebe bereitzustellen.

Gelöst wird die Aufgabe durch Bereitstellung eines Oberflächenbehandlungsmittels für Hartgewebe, umfassend mindestens ein Enzym und ein die Enzymaktivität begrenzendes Mittel. Bei Anwendung des Mittel verbleibt dieses auf dem Hartgewebe, wobei die Enzymaktivität zeitlich und/oder örtlich begrenzt wird.

In Abhängigkeit von der konkreten Ausführungsform wird das Oberflächenbehandlungsmittel der vorliegenden Erfindung erst durch Mischen der einzelnen Bestandteile, insbesondere des Enzyms und des die Enzymaktivität begrenzenden Mittels, unmittelbar vor der Anwendung bzw. beim Auftragen der einzelnen Bestandteile auf die zu behandelnde Oberfläche gebildet.

Mit den Begriffen „umfassen“ oder „enthalten“ wird eine nicht abschließende Aufzählung von Merkmalen eingeleitet. Der Umstand, dass in den Ansprüchen das Wort „ein“ vor Nennung eines Merkmals verwendet wird, schließt nicht aus, dass die genannten Merkmale mehrmals vorhanden sein können, im Sinne von „mindestens ein“.

Die erfindungsgemäßen Oberflächenbehandlungsmittel können beispielsweise in Bondingformulierungen in Kombination mit einem aktivitätsterminierenden Mechanismus eingesetzt werden, so dass das oder die Enzyme auf der Zahnhartsubstanz verbleiben können, ohne diese zu schädigen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Oberflächenbehandlungsmittel weisen unter anderem die folgende Vorteile auf:

Im Gegensatz zum Stand der Technik muss die Enzymlösung nicht jedesmal separat aufgetragen und abgespült werden. Dadurch werden dem Zahnarzt und dem Patienten drei zusätzliche Schritte (Auftragen einer Enzymlösung, Einwirken  
10 und anschließendes Abspülen) erspart, die Behandlung verkürzt und vereinfacht (anerkanntermaßen führt die Komplexität der klassischen vier Schritt Bonding Prozedur des öfteren zu Fehlern und schlechten klinischen Ergebnissen).

Ein weiterer Vorteil gegenüber dem Stand der Technik ist das Behalten der, für die Versiegelung und für die Haftung an der Zahnhartsubstanz wichtigen Hybridschicht,  
15 die auch noch eine wesentliche Funktion als elastischer Puffer zwischen Zahn und Dentalmaterial hat. Dies muss man sich dergestalt vorstellen, dass der Aufbau der Schichten mineralisiertes Dentin – Hybridschicht – Bonding – Dentalmaterial über einen Härtegradienten erfolgt, bei dem die Hybridschicht die wesentlich "Vermittlerrolle" übernommen hat.

20 Schließlich besteht bei den erfindungsgemäßen Oberflächenbehandlungsmitteln nun nicht mehr die Gefahr, dass bei unvollständigem Abspülen der verwendeten Enzymlösung diese zumindest teilweise auf dem Zahn verbleibt und dort – auch unter dem aufgetragenen Bonding - die Zahnhartsubstanz durch Abbau des vorhandenen Kollagens im angrenzenden Dentin schädigt.

25 Dass durch zu langen Verbleib von Kollagenase auf freigelegtem Dentin der Verbund tatsächlich stark geschädigt wird, ist in der vorliegenden Erfindung durch die Vergleichsbeispiele und Abbildung 1 gezeigt.

Die Erfindung stellt ferner eine Methode zur Verfügung, bei der einerseits die Bondingprozedur des Standes der Technik vereinfacht und verkürzt wird, und  
30 andererseits eine wesentliche Verbesserung von Haftwerten, Techniksensitivität und

Anfließverhalten an die mineralisierte Dentinoberfläche unter Beibehaltung der Hybridschicht erreicht wird.

Durch das Zerkleinern oder Modifizieren der Kollagenfasern durch Proteasen, erreicht man eine gleichmäßigere und immer gleiche Gestaltung der zu benetzenden Oberflächen. Da der Diffusionswiderstand der Monomermoleküle des Primers bzw. Bondings gegen zerkleinerte oder modifizierte Kollagenfasern wesentlich geringer ist, kann die Ausbildung einer guten Hybridschicht schneller und vollständiger erfolgen. Es ergibt sich ein immer gleiches und verbessertes Anfließverhalten, was eine vollständige Benetzung der mineralisierten Dentinoberfläche und damit auch eine geringere Sensitivität der Bondingtechnik zur Folge hat. In Konsequenz erhält man eine Verbesserung der klinischen Sicherheit der gesamten Füllung bei verbesserter Haftung. Des weiteren wird der Erhalt der Hybridschicht, mit all ihren oben genannten Vorteilen gewährleistet.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung der Enzyme lassen sich die Haftwerte von Füllungsmaterialien an Zähnen bzw. dem Bonding erhöhen und die Standardabweichung bei den Messungen erniedrigen, wodurch die Bereitstellung von Formulierungen möglich wird, die reproduzierbarere Ergebnisse liefern.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung liegt in dem verkürzten Verfahren, das den Einsatz der Enzyme direkt in den Bonding- oder Versieglermaterialien ermöglicht und damit dem behandelnden Arzt hilft, möglich Fehler zu vermeiden und für den Patienten die Behandlungszeit verkürzt.

Im folgenden wird die Erfindung näher beschrieben, wobei der Begriff Enzym sowohl proteolytische Enzyme, als auch Proteasen umfasst.

Als Proteasen kommen prinzipiell solche in Betracht, die fähig sind Kollagenfasern, wie sie im Zahnhartmaterial vorkommen, zu zerschneiden, und/oder solche, die fähig sind, die Kollagenfasern so zu verändern, dass diese ein verbessertes Löslichkeitsverhalten zeigen. Unter dem Begriff Proteasen gruppieren sich all jene Enzyme, die Proteine proteolytisch zu verändern vermögen. Zu den Proteasen gehören z.B. Peptidasen, Peptidylpeptidasen, Dipeptidasen, Dipeptidylpeptidasen, Oligopeptidasen, Proteinasen, Endopeptidasen, Exopeptidasen. Eine Klassifizierung von Proteasen kann auch hinsichtlich der an der proteolytischen Katalyse beteiligten

Aminosäuren oder Cofaktoren erfolgen. So unterscheidet man zwischen Serinpeptidasen, Cysteinpeptidasen, Aspartatpeptidasen und Metallopeptidasen und deren Unterklassen. Eine aktuelle Übersicht an proteolytisch wirksamen Enzymen wird in A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic*  
5 *Enzymes*, Academic Press, San Diego, 1998 gegeben, in der auch Proteasen genannt sind, die bisher noch nicht bestimmten Proteaseklassen zugeordnet werden konnten. Diese Aufzählung der erfindungsgemäßen Proteasen ist beispielhaft und in keiner Weise limitierend im Sinne der Erfindung zu verstehen. Üblicherweise verfügen Proteasen über definierte Wirkungsorte. So werden je nach Protease nur  
10 definierte Bereiche der Kollagenfasern angegriffen. Proteasen ermöglichen somit eine kontrollierte ortsspezifische Verwendung. Darüber hinaus kann die Aktivität von Proteasen zeitlich zielgerichtet gesteuert werden, wohingegen die chemische Reaktion der chemischen Agentien bis zum vollständigen Verbrauch abläuft.

Proteasen können im Sinne der Erfindung einzeln oder in Kombination mit anderen  
15 Proteasen eingesetzt werden.

Für den Einsatz der Enzyme kommen prinzipiell die folgenden Möglichkeiten und deren Kombinationen in Betracht:

- In einem separat aufgetragenen Conditioner, der üblicherweise neutral, ggf. auch sauer oder basisch sein kann;
- 20 • In einem üblichen für Bondings verwendeten Primer;
- In einem selbststützenden Primer;
- In einem sogenannten One-bottel-bond;
- In einem selbststützenden Bonding, sogenannten one-step bond oder auch all-in-one-adhäsiv;

25 Zusätzlich zu Enzymen können auch chemische Agentien eingesetzt werden, die Proteine zerschneiden oder in der Struktur zu verändern vermögen. Beispielhaft seien N-halogenierte Amine, Hypochlorit,  $H_2O_2$  genannt.

Das Oberflächenbehandlungsmittel enthält gegebenenfalls ferner eine oder mehrere Substanzen gewählt aus: Füllstoffen, insbesondere Permanent-Füllstoffen,  
30 Farbstoffen, Fließmodifikatoren, Stabilisatoren, Lösungsmittel, ionenabgebende

Substanzen, bakterizid oder antibiotisch wirksame Substanzen, die Röntgenopazität erhöhende Verbindungen oder weitere Modifikatoren.

Geeignete Initiatoren umfassen Campherchinon in Kombination mit Aminen (aromatische Amine), 1,2-Diketone und (Mono, Bis und Tris)-Acylphosphinoxide.

- 5 Geeignete radikalbildende Initiatoren sind in der Literatur beschrieben (z. B. J.-P. Fouassier, Photoinitiation, Photopolymerization and Photocuring, Hanser Publishers, Munich, Vienna, New York, 1995 oder auch J.-P. Fouassier, J. F. Rabek (Hrsg.), Radiation Curing in Polymer Science and Technology, Vol. II, Elsevier Applied Science, London, New York, 1993). Sie können durch UV- oder sichtbares Licht
- 10 aktivierbare Substanzen sein, wie Benzoinalkylether, Benzilketale, Acylphosphinoxide oder aliphatische und aromatische 1,2-Diketonverbindungen, beispielsweise Campherchinon, wobei die Katalysatoraktivität durch Zusatz von Aktivatoren, wie tertiären Aminen oder organischen Phosphiten, in an sich bekannter Weise beschleunigt werden kann.

- 15 Geeignete Initiatorsysteme zur Auslösung der radikalischen Polymerisation über einen Redox-Mechanismus sind beispielsweise die Systeme Peroxid/Amin, Peroxid/Barbitursäurederivate oder Peroxid/Säuren u. dergl. Bei Verwendung solcher Initiatorsysteme ist es zweckmäßig, einen Initiator (z. B. Peroxid) und eine Katalysatorkomponente (z. B. Amin) getrennt bereitzuhalten. Die beiden
- 20 Komponenten werden dann kurz vor ihrer Anwendung miteinander homogen gemischt.

- Polymerisierbare Substanzen umfassen insbesondere mono- oder polyfunktionelle Acrylate und Methacrylate, wie sie in der EP-A-0 480 472 beschrieben sind. Ebenfalls verwendbar sind funktionalisierte Monomere mit endständigen Acrylat-
- 25 oder Methacrylatgruppen, wie sie in der DE-A-2 312 559 und der EP-A-0 219 058 beschrieben sind. Typische Vertreter dieser Verbindungs-klasse (DE-A-4 328 960) sind Alkyl(meth)acrylate, einschließlich der Cycloalkyl(meth)acrylate, Aralkyl(meth)-acrylate und 2-Hydroxyalkyl(meth)acrylate, beispielsweise Hydroxypropylmethacrylat, Hydroxyethylmethacrylat, Isobornyl-acrylat, Isobornylmethacrylat,
- 30 Butylglycolmethacrylat, Acetylglycolmethacrylat, Triethylenglycoldimethacrylat, Polyethylenglycoldimethacrylat, 2-Phenylethylmethacrylat, 2-Ethylhexylmethacrylat, Cyclohexylmethacrylat, Laurylmethacrylat und Hexandioldi(meth)acrylat. Verwendet



werden können auch die langkettigen Monomere, wie sie in der US-A-3 066 112 beschrieben sind, auf der Basis von Bisphenol-A und Glycidylmethacrylat oder deren durch Addition von Isocyanaten entstandene Derivate. Geeignet sind auch Verbindungen des Typs Bisphenyl-A-diethyloxy(meth)acrylat und Bisphenol-A-  
5 dipropoxy(meth)acrylat. Weiterhin können die oligoethoxylierten und oligopropoxylierten Bisphenol-A-diacryl- und -dimethacrylsäureester Verwendung finden. Gut geeignet sind außerdem die in der DE-A-2 816 823 genannten Diacryl- und Dimethacrylsäureester des Bis(hydroxymethyl)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]-decans und die Diacryl- und Dimethacryl-säureester der mit 1 bis 3 Ethylenoxid- und/oder  
10 Propylenoxideinheiten verlängerten Verbindungen des Bis(hydroxymethyl)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]-decans. Es können auch Mischungen der genannten Monomeren verwendet werden. Besonders geeignet sind Methacrylate, wie Bis-GMA, HEMA, TEGDMA, Plex 6661 und saure Methacrylate, wie 4-META.

Geeignete Füllstoffe sind beispielsweise Aerosile (Aerosil 200, COK 84 von  
15 Degussa), Quarze, Gläser insbesondere desaktivierte bzw. nicht basische Gläser, Fällungskieselsäuren (HDKH).

Geeignete Stabilisatoren umfassen Radikalfänger, wie substituierte oder nicht-substituierte Hydroxyaromaten, insbesondere Methoxyphenol oder Jonol, HALS (Hinderd Amine Light Stabilizers), Schwermetallfänger, wie EDTA und lösliche  
20 Sulfate.

Bei den ionenabgebenden Substanzen sind solche bevorzugt, die die Freisetzung von Fluoridionen ermöglichen, wie Fluoridsalze der ersten oder zweiten Hauptgruppe, wie Natriumfluorid oder Calciumfluorid, oder komplexe Fluoridsalze, wie KZnF<sub>3</sub>, oder wie sie in der EP-A-0 717 977 beschrieben werden, Fluorid  
25 abgebende Gläser sowie Mischungen dieser Fluoridionenquellen.

Als bakterizid oder antibiotisch wirksame Substanzen können beispielsweise Chlorhexidin, Pyridiniumsalze oder die üblichen pharmazeutischen Substanzen, wie  $\beta$ -Lactamantibiotika (Penicilline), Cephalosporine, Tetracycline, Ansamycine, Kanamycine, Chloramphenicol, Fosfomycin, antibakterielle Makrolide, Polypeptid-  
30 Antibiotika, Chemotherapeutika, wie Sulfonamide, Dihydrofolatreduktase-Hemmstoffe, Nitrofurant-Derivate oder Gyrasehemmer verwendet werden.

Für die Wahl und Durchführung des aktivitätsterminierenden Mechanismus ist es im wesentlichen entscheidend, welches Enzym für die proteolytische Modifizierung des Kollagens verwendet wird.

Im folgenden werden einige bevorzugte Ausführungsformen genannt, die die Ausführung der Erfindung prinzipiell erklären, wobei auch diese Ausführungsformen in keiner Weise limitierend oder die Erfindung beschränkend zu verstehen sind.

Eine Möglichkeit die Erfindung auszuführen ist beispielsweise die Änderung des pH-Wertes der "Arbeitsumgebung" der Protease.

Verwendet man beispielsweise von *Clostridium histolyticum* eine Clostridiopeptidase A mit einem pH-Optimum um 7,0 so kann durch Absenken des pH-Wertes durch beispielsweise Zusatz von Säuren zu der verwendeten Mischung die Aktivität der verwendeten Protease beendet werden.

In einer anderen Ausführungsform kann das Enzym beispielsweise in bzw. mit einem neutralen Primer aufgetragen werden und wird nach der notwendigen Einwirkzeit mit dem sauren Bond überschichtet.

Eine weitere Ausführungsform liegt beispielsweise im Zusatz von säurebildenden Photopolymerisationsinitiatoren, wie sie in der WO-98/47046 oder in der DE-A-197 36 471 und DE-A-197 43 564 beschrieben sind. Diese werden durch einen Belichtungsschritt aktiviert und sorgen so für eine Absenkung des pH-Wertes.

Werden säuresensible Proteasen verwendet, so sollte die zur Aktivitätsterminierung notwendige pH-Absenkung, ausgehend vom pH-Optimum der jeweiligen Protease oder Proteasegemisches, soweit erfolgen, bis die Aktivitätsterminierung erreicht ist.

Dies kann in einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben oder acht pH-Stufen erreicht werden. Welche pH-Stufen bevorzugt, bzw. besonders bevorzugt sind, hängt von der jeweilig zur Anwendung gebrachten Protease oder Proteasemischung ab (A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, San Diego, 1998).

Andererseits kann man auch beispielsweise bei saurem pH-Milieu arbeitende Enzyme wie Pepsin verwenden. Da diese bei einem pH-Wert von 1 bis 5 arbeiten, können sie direkt in der sauren Bondingrezeptur eingesetzt werden.

Die "Abschaltung" der Proteaseaktivität erfolgt durch Neutralisation der sauren Komponenten im Bonding durch den Hydroxylapatit-Anteil des Dentins. Der pH-Wechsel führt hier einerseits zu einer Aktivitätsterminierung des Pepsins und andererseits wird Pepsin bei einem pH größer pH 7 irreversibel inaktiviert (A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, San Diego, 1998, S. 810.

Bei dieser Art der Ausführungsform der Erfindung ist bei der Verwendung einer definierten Protease ableitbar, welcher Art die pH-Wertänderung sein muss, um die Aktivitätsterminierung zu erreichen.

Eine weitere Möglichkeit der Erfindungsausführung liegt in der örtlichen Begrenzung der Proteasewirkung. Dies kann beispielsweise in der Derivatisierung der Protease mit großen Molekülen wie Agarose (z.B. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Katalog 1999, P3286) oder durch Kopplung der Proteasen an in Bonding allgemein verwendeten Füllstoffen wie Quarze, Gläser oder Kieselgele (Herstellung der Enzymderivate beispielsweise nach J. Chem. Technol. Biotechnol., 1992, 54 (3), 215 -21) erfolgen. Prinzipiell ist jede Derivatisierung geeignet, die die Diffusion der Protease herabsetzt.

Die Herabsetzung der Diffusion kann, muss aber nicht, mit einem aktivitäts-terminierenden Mechanismus kombiniert werden. Eine proteolytisch aktive Protease kann in der Hybridschicht oder im Haftverbund zwischen Zahnhartsubstanz und Dentalmaterial verbleiben, wenn durch eine Diffusionshemmung sichergestellt wird, dass die Protease mit seiner proteolytischen Aktivität nicht in tiefere Schichten vordringen kann. Vorteilhaft ist es wenn die Protease daran gehindert wird, unkontrolliert in tiefere Schichten der Zahnhartsubstanz vorzudringen.

Eine andere Möglichkeit der ortsspezifischen Fixierung der verwendeten Proteasen ist der Einbau der Proteasen in die Polymermatrix des Primers, und/oder des Bondes.

Beispielsweise ist hier die Derivatisierung mit Monomermolekülen, die fähig sind, mit den Molekülen der Primer oder/und Bondingmatrix chemische Bindung einzugehen, möglich. Dies kann in radikalisch polymerisierenden Systemen, beispielsweise durch Modifizierung der Proteasen mit Methacrylsäurederivaten, erreicht werden.

Es ist aber auch eine Addition oder Kondensation über funktionelle Gruppen der Proteasen selbst, beispielsweise über  $\text{NH}_2$ , SH, COOH, oder C-C-Doppelbindungen denkbar. Bei kationischen Systemen ist beispielsweise auch die Addition von beispielsweise  $\text{NH}_2$ - oder SH-Gruppen direkt an ein Epoxidmonomer der Matrix  
5 möglich, so dass hierfür nicht einmal eine Derivatisierung der eigentlichen Protease notwendig ist. Vorteilhaft ist es, wenn die Protease chemisch in die Polymermatrix eingebunden wird.

Die ortsspezifische Fixierung der Protease durch chemische Einbindung in die Polymermatrix kann, muss aber nicht, mit einem aktivitätsterminierenden Mechanismus kombiniert werden. Eine proteolytisch aktive Protease kann in der Hybridschicht  
10 oder im Haftverbund zwischen Zahnhartsubstanz und Dentalmaterial verbleiben, wenn durch die chemische Einbindung in die Polymermatrix sichergestellt ist, dass die Protease mit seiner proteolytischen Aktivität nicht in tiefere Schichten vordringen kann. Vorteilhaft ist es, wenn die Protease daran gehindert wird, unkontrolliert in  
15 tiefere Schichten der Zahnhartsubstanz vorzudringen.

Eine weitere Möglichkeit die Aktivitätsterminierung der verwendeten Proteasen durchzuführen liegt in einer kurzzeitigen, für die Zahnhartsubstanz nicht schädlichen Erhöhung der Temperatur. Dies kann beispielsweise durch Zuführung von Energie aus einer externen Quelle (beispielsweise übliche Wärmequellen, übliche verwendet  
20 Polymerisationslampen, wie Elipar Trilight (Fa. Espe, Seefeld), aber auch Plasmalampen oder Laser oder elektromagnetische Strahler, oder Ultraschall, aber auch durch Erzeugung von chemischer Energie, wie die Polymerisationswärme eines nachträglich aufgebrachtten Füllungsmaterials selbst erfolgen.

Eine andere Möglichkeit der Aktivitätsterminierung liegt in dem Zusatz von redox-aktiven Substanzen. Diese werden beispielsweise durch Belichtung des  
25 Primers/Bondings/Versieglers aktiviert und zerstören dann die Protease auf chemischem Wege. Als Beispiele für diese redoxaktiven Substanzen seien Radikalbildner wie übliche radikalbildende Initiatoren genannt. Diese sind in der Literatur beschrieben (z. B. J.-P. Fouassier, Photoinitiation, Photopolymerization and Photocuring, Hanser Publishers, Munich, Vienna, New York, 1995 oder auch J.-P.  
30 Fouassier, J. F. Rabek (Hrsg.), Radiation Curing in Polymer Science and Technology, Vol. II, Elsevier Applied Science, London, New York, 1993). Diese

können durch UV- oder sichtbares Licht aktivierbar sein, wie beispielsweise Benzoinalkylether, Benzilketale, Acylphosphinoxide oder aliphatische und aromatische 1,2-Diketonverbindungen, beispielsweise Campherchinon, wobei die Katalysatoraktivität durch Zusatz von Aktivatoren, wie tertiären Aminen oder  
5 organischen Phosphiten, in an sich bekannter Weise beschleunigt werden kann.

Geeignete Initiatorsysteme zur Auslösung der radikalischen Polymerisation über einen Redox-Mechanismus sind beispielsweise die Systeme Peroxid/Amin, Peroxid/Barbitursäurederivate oder Peroxid/Säuren. Bei Verwendung solcher Initiatorsysteme ist es zweckmäßig, einen Initiator (z. B. Peroxid) und eine Kataly-  
10 satorkomponente (z. B. Amin) getrennt bereitzuhalten. Die beiden Komponenten werden dann kurz vor ihrer Anwendung miteinander homogen vermischt.

Eine weitere Möglichkeit der Aktivitätsterminierung liegt in der Hemmung von enzymaktivitätsentscheidenden Gruppen, Substanzen oder Cofaktoren.

Beispielsweise können die Metalle von Metallopeptidasen durch beispielsweise  
15 übliche Komplexbildner, wie Chelatisierungsmittel, wie EDTA oder seine Salze, komplexiert werden. Bei dieser Ausführungsform der Erfindung kommt es darauf an, das die Affinität des zugesetzten Komplexbildners zum Targetmetall höher als die der Protease zu dem Metall ist. Bevorzugt sind Komplexbildner mit einer hohen Affinität gegenüber bivalenten Kationen, besonders bevorzugt solche mit einer  
20 hohen Affinität gegenüber Zink, Cobalt, Eisen oder Mangan. Die Komplexbildner werden mindestens in äquimolaren Mengen eingesetzt. Enthalten die verwendeten Metallopeptidasen zwei, kokatalytisch wirkenden Metallionen (Cobalt und Mangan basierende und einige der Zink basierenden Metallopeptidasen), so können die Komplexbildner zur besseren Wirkung auch im Molverhältnis zwei zu eins berechnet  
25 auf Metallionen eingesetzt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Inhibierung dieser Proteasen liegt in der Zugabe von Ionen die schwerlösliche Salze mit den genannten Ionen bilden, wie Hydroxy-, Sulfid-, Phosphat-, Sulfat- oder Carbonationen.

Eine andere Aktivitätsterminierung ist bei solchen Proteasen möglich, deren  
30 katalytische Aktivität von Thiolgruppen oder Hydroxylgruppen abhängig ist. Hier ist es möglich, durch übliche Oxidationsmittel oder durch kovalente Modifikation z.B.

Alkylierungsmittel, eine Aktivitätsterminierung der proteolytischen Aktivität der Proteasen zu erreichen.

Auch ist es möglich, eine Aktivitätsterminierung durch Zugabe von kommerziell erhältlichen Proteaseinhibitoren bzw. deren Mischungen, wie Pepstatin A (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Katalog 1999) zu erreichen.

In dieser Ausführungsform der Erfindung wird die Proteasehemmer-Mischung nach ausreichender Einwirkzeit der verwendeten Protease, bzw. der Proteasemischung mit der Protease bzw. Proteasemischung in Kontakt gebracht und ebenfalls auf der Zahnhartsubstanz belassen.

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivitätsminimierung ist der nachgeschaltete Einsatz eines weiteren Enzyms, das nicht in der Lage ist, Kollagen zu zerschneiden oder modifizieren. Dieses weitere Enzym muss dann in der Lage sein, das kollagenabbauende bzw. -modifizierende Enzym zu deaktivieren.

Proteasen können entweder in einem separaten Schritt aufgetragen oder bevorzugt direkt in den Versiegeln oder Bondings bzw. auch Primern oder Conditionern eingesetzt werden. Selbstverständlich ist auch eine Kombination der oben gezeigten Ausführungsformen möglich. Ebenfalls kann auch eine chemische und/oder physikalische Aktivitätsterminierung im Sinne einer Denaturierung des Enzyms durch allgemein bekannte Methoden wie z.B. Säurefällung, Aussalzen, Hitzefällung, Lösungsmittelkoagulation bzw. Strukturveränderung ( gleichbedeutend im Sinne des

gesagten) oder Koagulation durch Schwermetallzusatz möglich.

Werden die Proteasen in einer separaten Lösung eingesetzt, so haben die Lösungen beispielsweise eine Konzentration von 0,001mg/ml bis 10 mg/ml bevorzugt von 0,001 mg/ml bis 1 mg/ml besonders bevorzugt von 0.01 mg/ml bis 0,2 mg/ml.

Als Lösungsmittel können alle wässrigen und organischen Lösungsmittel eingesetzt werden, die die Aktivität der Enzyme nicht soweit beeinträchtigen, dass deren erfindungsgemäße Einsatz unmöglich gemacht wird. Bevorzugt sind wässrige Lösungen mit oder ohne Puffersysteme wie entionisiertes Wasser, Phosphat-Puffer, Tris-Puffer, und Glycin-Puffer. Geeignet sind auch Lösungsmittel, wie Dialkylketone (z. B. Aceton, Methyl-ethylketon), Acetylaceton oder Alkohole (z. B. Ethanol, Propanol) oder auch dünnfließende polymerisierbare Substanzen wie 2-

Hydroxyethylmethacrylat oder (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat sowie Mischungen davon.

Werden die Enzyme direkt im Versiegler oder im Bonding eingesetzt, so haben die Lösungen beispielsweise eine Konzentration von 0,001mg/ml bis 20 mg/ml  
5 bevorzugt von 0,001 mg/ml bis 1 mg/ml besonders bevorzugt von 0.01 mg/ml bis 0,2 mg/ml.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher beschrieben.

#### Vorbereitung der Rinderzähne

10 Pro Versuch werden fünf nach dem Extrahieren tiefgefrorene Rinderzähne aufgetaut, von restlichem Zahnfleisch gereinigt und die Wurzel durch Absägen mit einer Diamantsäge abgetrennt. Die noch verbleibende Pulpa wird mit Hilfe einer Pulpanadel entfernt und die Zähne dann mit Leitungswasser gespült. Plane Dentinoberflächen werden durch labiales Schleifen der Zähne an einer  
15 wassergekühlten Diamantschleifmaschine erhalten. Die Zähne werden dann so in Silikon eingebettet, dass die abgeschliffene, gut feucht gehaltene Oberfläche nach oben zeigt und erst dann noch mal mit einem feinen Siliziumcarbidschleifpapier nachgearbeitet. Dann wird auf jeden Zahn ein Wachsplättchen aufgeklebt, welches eine Ausstanzung von 6 mm Durchmesser hat (Prüffeld). Die so erhaltenen  
20 Prüfkörper werden in Anlehnung an das praxisübliche Vorgehen ("All-etch-Technik") mittels einer üblichen Phosphorsäurelösung (Ätzel Minitip<sup>®</sup>, Fa. ESPE Dental AG, Seefeld) für 20 Sekunden angeätzt und anschließend mit Wasser gründlich abgespült.

#### 25 Ausführungsbeispiel 1

##### Aktivitätsterminierung durch pH-Änderung

Rinderzähne wurden entsprechend dem oben beschriebenen Verfahren vorbereitet. Anschließend wurden in einer wässrigen Lösung 20 µg Kollagenase aus Clostridium histolyticum Typ Ia (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Katalog 1999) in 5 µl  
30 entionisierten Wasser in das Prüffeld aufgebracht und gleichmäßig verteilt. Nach

fünfminütiger Inkubation wurde das saure Pertac Universal Bond (Fa. ESPE Dental AG, Seefeld) nach Herstellervorschrift aufgebracht und nach Herstellervorschrift ausgehärtet. Anschließend wurde die Bondingschicht mit 50 µl entionisierten Wasser überschichtet. Nach einer Stunde wurden 40 µl von der Probe auf der Bondingschicht mit einer Pipette aufgenommen und zu einer Reagenzlösung zur Bestimmung der Kollagenase-Aktivität gegeben. In 960 µl Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (pH 7,0; 100 mM) befand sich 50 µg fluoreszenzmarkierte Gelatine (Fa. Molecular Probes, Göttingen). Die Gegenwart von Kollagenase-Aktivität ist an der Zunahme der Fluoreszenz beobachtbar. Die Anregungswellenlänge war nach Herstellervorschrift 495 nm und die Fluoreszenzemission wurde nach Herstellervorschrift bei 515 nm in einem Fluoreszenzphotometer der Fa. Kontron (SFM 25) gemessen. Es konnte keine Kollagenase-Aktivität gemessen werden.

Durch Überschichten der Kollagenase mit einem sauren Bonding wird die Aktivität des Enzyms, das ein pH-Optimum im Bereich von pH 7 aufweist, deaktiviert.

15

In einem Kontrollversuch wurden 20 µg Kollagenase in 50 µl Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (pH 7,0; 100 mM) auf eine ausgehärtete Bondingschicht aufgebracht. Nach einer Stunde wurde die Kollagenase-Aktivität bestimmt. Innerhalb einer Minute nahm die relative Fluoreszenz um über 100 % zu. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde die ausgehärtete Bondingschicht direkt mit 50 µl der fluoreszenzmarkierten Gelatine-Lösung überschichtet. Es konnte keine Kollagenase-Aktivität nachgewiesen werden.

20

Die durch das Pertac Universal Bond bedingte Versauerung hat die Kollagenase-Aktivität terminiert.

25

### Ausführungsbeispiel 2

#### Aktivitätsterminierung durch pH-Änderung

2,5 ml einer Pepsinlösung (10 µg/ml) in einem 20 mM Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH 2,0) wurden zu 1 g gemahlenem Rinderdentin gegeben und dort unter Schütteln für 20 min belassen. Anschließend wurde die Mischung für 1 min in einer

30



Heraeus Biofuge Pico bei 10.000 rpm zentrifugiert. 900 µl des Überstandes wurden mit 12 µg fluoreszenzmarkiertem Casein (Fa. Molecular Probes, Göttingen) in 100 µl 20 mM Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH 2,0) versetzt. Die Gegenwart proteolytischer Pepsinaktivität zeigt sich an der Zunahme der Fluoreszenz bei einer  
5 Anregungswellenlänge von 480 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm. Die Messungen zeigten, dass durch die alkalisierende Wirkung des Dentins der pH soweit ins Alkalische verschoben wurde, so dass keine Pepsinaktivität mehr feststellbar war.

### 10 Ausführungsbeispiel 3

#### Aktivitätsterminierung durch Diffusionshemmung

Es wurde Agarose gekoppeltes Pepsin verwendet, kommerziell erhältlich bei der Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen. Hiervon wurden 10 µg in die wässrige Phase von Prompt L-Pop (ESPE Dental AG, Seefeld) gegeben. Nach Herstellervorschrift wurde  
15 die wässrige Phase mit der zweiten Komponente des Bondings vermischt. Die Mischung wurde in eine 96er-Mikrotiterplatte überführt und mit einer Elipar Highlight Beleuchtungseinheit (Fa. ESPE Dental AG, Seefeld) durch Lichtpolymerisation (40 sec) ausgehärtet.

Die Bondingschicht wurde mit 100 µl Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (50 mM, pH  
20 2,0), enthaltend 5 µg fluoreszenzmarkiertes Casein (Fa. Molecular Probes) überschichtet. Nach 30 min wurde mit einer Pipette 90 µl von der Bondingoberfläche entnommen und mit 110 µl des Dinatriumhydrogenphosphatpuffers vermischt. Die Fluoreszenzzunahme wurde bei 510 nm Emission (Anregung bei 480 nm) gemessen. Die Zunahme der relativen Fluoreszenz um 30 % zeigte an, dass an der  
25 Oberfläche der Bondingschicht proteolytisch aktives Pepsin vorlag.

Es wird somit gezeigt, dass das Enzym aktiv bleiben kann, aber die Mobilität des Enzyms durch Kopplung an Agarose eingeschränkt wird und das Enzym somit nicht in tiefere Schichten des Dentins wandern kann.

In einem Kontrollversuch wurde die ausgehärtete Pepsin/Bondingschicht (Prompt-L-  
30 Pop, ESPE Dental AG, Seefeld) mit 100 µl Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (50

mM. pH 2,0) überschichtet. Nach 30 min wurde mit einer Pipette 90 µl von der Bondingoberfläche entnommen und mit 110 µl des Dinatriumhydrogenphosphatpuffer enthaltend 5 µg fluoreszenzmarkiertes Casein (Fa. Molecular Probes) vermischt. Die relative Fluoreszenz wurde bei 510 nm Emission (Anregung bei 480 nm) bestimmt.

- 5 Im Vergleich zur Kontrollprobe, die 5 µg fluoreszenzmarkiertes Casein in 200 µl Meßlösung enthielt, konnte keine Fluoreszenzzunahme beobachtet werden. Dies belegt, dass an Agarose gekoppeltes Enzym die ausgehärtete Bondingschicht nicht verlassen kann.

#### 10 Ausführungsbeispiel 4

- Die Vorbereitung der Rinderzähne und der Prüffelder auf den Rinderzähnen wurde unter "Vorbereitung Rinderzähne" beschrieben. EBS-Multi der Fa. ESPE Dental AG, Seefeld beinhaltet neben einem Ätzel, eine Primer-Lösung und eine Bonding-Lösung. In 1 ml Primer-Lösung wurde 1 mg Kollagenase aus Clostridium histolyticum Typ Ia (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen Katalog 1999) gelöst. In das Prüffeld wurde nach Gebrauchsanweisung das Bonding EBS-Multi eingebracht, wobei vergleichend der Primer mit Kollagenase und ohne Kollagenase verwendet wurde. Anschließend wurde nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers eine Füllung Pertac (Fa. ESPE Dental AG, Seefeld) eingebracht. Nach 24-stündiger Lagerung bei 36°C und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Wachsplättchen entfernt und die Prüfkörper in einem Zugversuch (Zwick-Universalprüfmaschine) abgezogen.

- Der durchschnittliche Haftwert von 5 Rinderzähnen, der mit der Primer-Variante ohne Kollagenase erzielt wurde, betrug 3,96 MPa mit einer Standardabweichung von 31 %. Der durchschnittliche Haftwert der mit der Primer-Variante mit Kollagenase erzielt wurde, betrug 10,5 MPa mit einer Standardabweichung von 8,7 %.

Durch Integration der Kollagenase in den ein Primer-System konnten somit signifikant die Haftwerte erhöht und die Standardabweichung der Haftwerte verringert werden.

### Ausführungsbeispiel 5

Die Vorbereitung der Rinderzähne und der Prüffelder auf den Rinderzähnen wurde unter "Vorbereitung Rinderzähne" beschrieben. Prompt L-Pop (Fa. ESPE Dental AG, Seefeld) besteht aus einer wässrigen Phase und einer Polymermonomerphase, die in einer Blisterverpackung in zwei getrennten Kammern vorgehalten werden.

Aus einer Reihe von Blistern wurden die Flüssigkeiten entnommen. Die wässrige Phase wurde mit Pepsin bis zu einer Konzentration von 5 mg pro ml angereichert. Wässrige Phase und Polymermonomerphase wurden in einem Verhältnis von 1:5 gemischt, so dass die Endkonzentration von Pepsin 1 mg pro ml Bonding erreicht wurde.

In das Prüffeld wurde nach Gebrauchsanweisung das Bonding Prompt L-Pop eingebracht, wobei vergleichend die wässrige Phase einmal mit und einmal ohne Pepsin-Zusatz verwendet wurde. Anschließend wurde nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers eine Füllung Hytac (Fa. ESPE Dental AG, Seefeld) eingebracht. Nach 24-stündiger Lagerung bei 36°C und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Wachsplättchen entfernt und die Prüfkörper in einem Zugversuch (Zwick-Universalprüfmaschine) abgezogen.

Der durchschnittliche Haftwert von 5 Rinderzähnen, der mit der Prompt L-Pop Variante ohne Pepsin erzielt wurde, betrug 4,1 MPa mit einer Standardabweichung von 39 %. Der durchschnittliche Haftwert von 5 Rinderzähnen, der mit der Prompt L-Pop Variante mit Pepsin erzielt wurde, betrug 5,9 MPa mit einer Standardabweichung von 9 %.

Durch Integration von Pepsin in ein Bonding konnten somit signifikant die Haftwerte erhöht und die Standardabweichung der Haftwerte erniedrigt werden.

### Vergleichsbeispiele:

Im ersten Versuch wurden die Rinderzähne ohne weitere Behandlungsschritte dem unten beschriebenen Bonding- und Füllungsverfahren unterzogen. Es erfolgte dann die Überprüfung des Haftverbundes erfolgt durch einen Haftabzugsversuch mit einer Zwick-Universalprüfmaschine.

- Im zweiten Versuch wurden die Rinderzähne mit einer Kollagenaselösung behandelt. Eingesetzt wurde eine kommerziell erhältliche Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* Typ Ia (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Katalog 1999). Auf jeden Rinderzahn wurden jeweils 50 µg Kollagenase in 50 µl Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH 7,0; 50 mM) mittels Pipette in das Prüffeld aufgebracht. Nach fünf-minütiger Inkubation wird die Kollagenase-Lösung gründlich abgespült. Es folgt das unten beschriebene Bonding- und Füllungsverfahren und dann die Überprüfung des Haftverbundes durch einen Haftabzugsversuch mit einer Zwick-Universalprüfmaschine
- Im dritten Versuch werden die Rinderzähne nach dem selben Verfahren behandelt wie im zweiten Versuch beschrieben. Diesmal beträgt die Inkubationszeit 25 min.

#### Bonding-und Füllungsverfahren

- In das Prüffeld wurde nach Gebrauchsanweisung das Bonding EBS-Multi® (Fa. ESPE Dental AG, Seefeld) eingebracht und anschließend wurde nach Gebrauchsanweisung des Herstellers eine Füllung mit Hytac® (Fa. ESPE Dental AG, Seefeld) eingebracht. Nach 24-stündiger Lagerung bei 36°C und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Wachsplättchen entfernt und die Prüfkörper in einem Zugversuch (Zwick-Universalprüfmaschine) abgezogen. Die dabei ermittelten durchschnittlichen Dentinhaftwerte von jeweils fünf Rinderzähnen sind Abbildung 1 zu entnehmen.

#### Legende zu Abbildung 1

- Auf der Y-Achse werden die ermittelten durchschnittlichen Haftwerte der Haftversuche auf Rinderdetin in MPa angegeben. Die X-Achse wird entsprechend den drei durchgeführten Versuchen nach Inkubationszeiten mit der Kollagenase-Lösung unterteilt. 0 min: keine Kollagenase-Inkubation; 5 min: Kollagenase-Inkubation für 5 min; 25 min: Kollagenase-Inkubation für 25 min. Unter jedem Ergebnisbalken ist eine REM-Aufnahme der bei der Behandlung entstehenden Dentinoberfläche abgebildet.

### Röntgenelektronenmikroskopische Untersuchung

Jeweils ein Rinderzahn wurde nach dem für die Versuche eins, zwei und drei beschriebenen Verfahren behandelt. Das Bonding- und Füllungsverfahren wurden  
5 nicht durchgeführt. Die Zähne wurden getrocknet und mit einem Gerät der Fa. Balzers Union bespattiert. Anschließend wurden die behandelten Rinderdentin-  
oberflächen mit einem REM-Gerät der Fa. Hitachi mikroskopisch untersucht. Abbildungen der Oberflächen sind in Abbildung 1 in einer 1000-fachen Vergrößerung zu sehen.

**Patentansprüche**

1. Oberflächenbehandlungsmittel, umfassend ein Enzym und ein die Enzymaktivität begrenzendes Mittel.
- 5 2. Oberflächenbehandlungsmittel nach Anspruch 1, enthaltend mindestens eine Substanz gewählt aus: Füllstoffe, Farbstoffe, Fließmodifikatoren, Stabilisatoren, Initiatoren, Lösungsmittel, ionenabgebende Substanzen, bakterizid oder antibiotisch wirksame Substanzen, die Röntgenopazität erhöhende Verbindungen.
- 10 3. Oberflächenbehandlungsmittel nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das die Enzymaktivität begrenzende Mittel gewählt ist aus Säuren, Basen, Puffern, polymerisierbare Substanzen, radikalbildenden Stoffen, Salzen, oxidierbaren oder reduzierbaren Stoffen, Proteasehemmern, nicht-kollagen-modifizierenden Enzymen und/oder diffusionshemmenden Stoffen.
- 15 4. Oberflächenbehandlungsmittel nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Enzym gewählt ist aus der Gruppe der Peptidasen, Peptidylpeptidasen, Dipetidasen, Dipeptidylpeptidasen, Oligopeptidasen, Proteinasen, Endopeptidasen, Exopeptidasen, Serinpeptidasen, Cysteinpeptidasen, Aspartatpeptidasen, Metallopeptidasen.
- 20 5. Kit, enthaltend ein Oberflächenbehandlungsmittel nach einem der vorstehenden Ansprüche und mindestens einen Bestandteil gewählt aus: Bondingmaterial, Primer, Säure, weiteres Zahnkonditionierungsmittel und/oder Füllungsmaterial.
6. Verwendung von die Enzymaktivität begrenzenden Mitteln zur Herstellung eines Oberflächenbehandlungsmittels in einem Verfahren zur Oberflächenbehandlung  
25 von Hartgewebe unter Verwendung eines Mittels, enthaltend ein Enzym, wobei das enzymhaltige Mittel auf dem Hartgewebe verbleibt.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das die Enzymaktivität begrenzende Mittel gewählt ist aus: Säuren, Basen, Puffern, polymerisierbare Substanzen, Salzen, radikalbildenden Stoffen, oxidierbaren oder reduzierbaren Stoffen, Protease-

hemmern, nicht-kollagenmodifizierenden Enzymen, diffusionshemmenden Stoffen und/oder Temperaturerhöhung.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 7, wobei das Enzym gewählt ist aus: der Gruppe der Peptidasen, Peptidylpeptidasen, Dipetidasen, Dipeptidylpeptidasen, Oligopeptidasen, Proteinase, Endopeptidasen, Exopeptidasen, Serinpeptidasen, Cysteinpeptidasen, Aspartatpeptidasen, Metallopeptidasen.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei es sich bei dem Hartgewebe um Zahnschubstanz handelt.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei das Verfahren zur Oberflächenbehandlung das Aufbringen mindestens eines Materials umfasst, gewählt aus: Bonding, Primer, Conditioner, Füllungsmaterial.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, wobei das Mittel vor der Oberflächenbehandlung durch Mischen eines Enzyms und eines die Enzymaktivität begrenzenden Mittels hergestellt wird.
12. Verfahren zur Oberflächenbehandlung von Hartgewebe, umfassend die Schritte:
  - a) Auftragen eines Oberflächenbehandlungsmittels, enthaltend ein Enzym und gegebenenfalls ein die Enzymaktivität begrenzendes Mittel, b) Überschichten des Mittels aus Schritt a) mit einem Material gewählt aus: Bondingmaterial, Primer, Säure, Zahnkonditionierungsmittel und/oder Füllungsmaterial, wobei das Oberflächenbehandlungsmittel auf dem Hartgewebe verbleibt und die Aktivität des Enzyms durch das die Enzymaktivität begrenzende Mittel aus Schritt a) und/oder durch das Überschichten des Mittels aus Schritt a) mit dem Material aus Schritt b) begrenzt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei es sich bei dem Hartgewebe um Zahnschubstanz handelt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 13, wobei das oder die Enzyme gewählt sind aus der Gruppe der Peptidasen, Peptidylpeptidasen, Dipetidasen, Dipeptidylpeptidasen, Oligopeptidasen, Proteinase, Endopeptidasen, Exopepti-

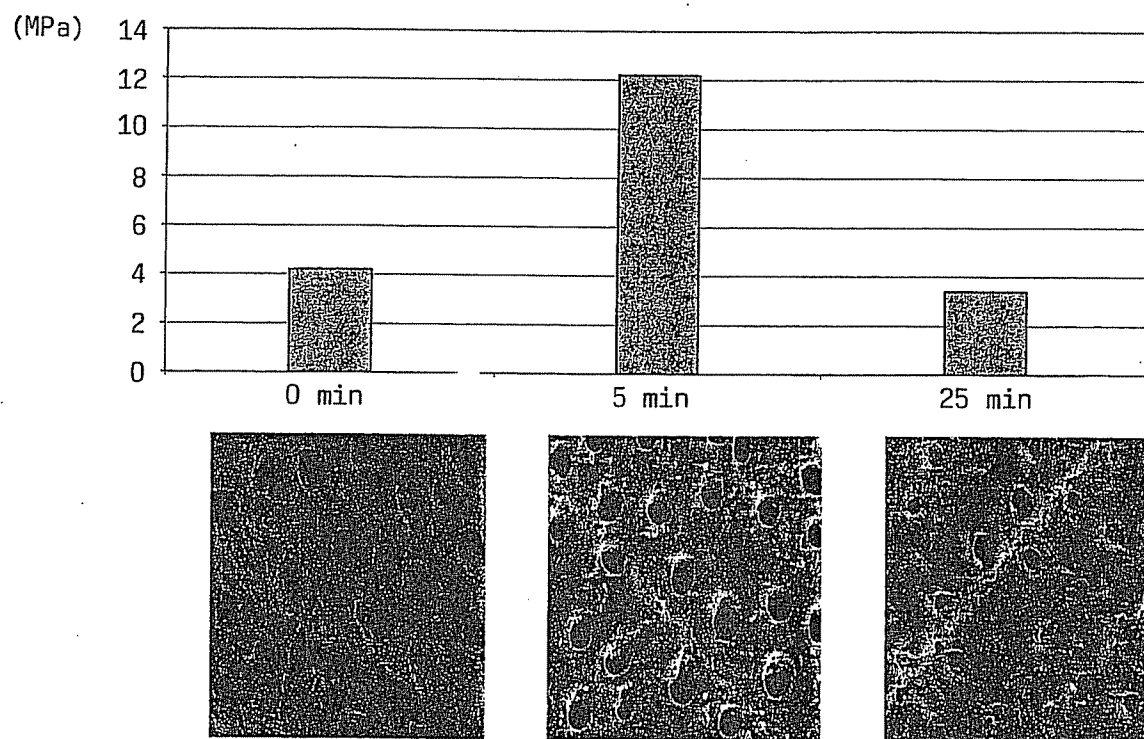
dasen, Serinpeptidasen, Cysteinpeptidasen, Aspartatpeptidasen, Metallopeptidasen.

- 5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei die Aktivität des Enzyms begrenzt wird durch die Bildung von Radikalen, die Änderung des pH-Wertes, der Temperatur, der Salzkonzentration, des Lösungsmittels, des Redox-  
potentials, einer Modifikation der katalytischen Gruppe des verwendeten Enzyms, Zusatz von Proteasehemmern, Bindung des Enzyms an diffusions-  
hemmende Stoffe, Einpolymerisation in diese und/oder den Zusatz von nicht kollagenmodifizierenden Enzymen.



1/1

Fig.1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11187

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K6/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, COMPENDEX, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOHISKE T ET AL: "A study on cytochrome c oxidoreductase for bonding a tri-n-butylborane-initiated luting agent to dentin" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 48, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 697-699, XP000997686 the whole document	1-15
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 197630 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1976-56868X XP002164706 & JP 51 067346 A (LION DENTIFRICE CO LTD), 10 June 1976 (1976-06-10) abstract	1-4, 6-9, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 April 2001

Date of mailing of the international search report

23/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thornton, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11187

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 5 762 502 A (STEWART GREGORY P ET AL)            9 June 1998 (1998-06-09)            cited in the application            claims</p> <p>-----</p>	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/11187

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 51067346 A	10-06-1976	JP 1282097 C	27-09-1985
		JP 60003041 B	25-01-1985
US 5762502 A	09-06-1998	WO 9916378 A	08-04-1999

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 A61K6/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, COMPENDEX, INSPEC		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	YOHSUKE T ET AL: "A study on cytochrome c oxidoreductase for bonding a tri-n-butylborane-initiated luting agent to dentin" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, Bd. 48, Nr. 5, Mai 1999 (1999-05), Seiten 697-699, XP000997686 das ganze Dokument	1-15
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 197630 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1976-56868X XP002164706 & JP 51 067346 A (LION DENTIFRICE CO LTD), 10. Juni 1976 (1976-06-10) Zusammenfassung	1-4, 6-9, 11
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen         </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie         </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
4. April 2001		23/04/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Thornton, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 762 502 A (STEWART GREGORY P ET AL) 9. Juni 1998 (1998-06-09) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche -----	1-15

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internal. des Aktenzeichens

PCT/EP 00/11187

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 51067346 A	10-06-1976	JP 1282097 C	27-09-1985
		JP 60003041 B	25-01-1985
US 5762502 A	09-06-1998	WO 9916378 A	08-04-1999